

• 临床检验研究论著 •

## 呼吸内科多重耐药铜绿假单胞菌相关耐药基因检测分析\*

蓝 锴,程招敏,唐小龙,周 强,张 文,庞雪云  
(广州中医药大学第二附属医院检验医学部,广州 510120)

**摘要:**目的 了解该院呼吸内科分离多重耐药铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因和  $\beta$ -内酰胺酶基因携带情况。方法 用聚合酶链反应技术检测 14 株多重耐药铜绿假单胞菌耐药相关基因。结果 除 GIM、SPM、VIM-1、VIM-2、CTX-M、aac(3')-I、aac(3')-II、ant(3'')-I 基因全部为阴性外,其余耐药基因有不同程度的阳性。结论 携带多种耐药基因是呼吸内科多重耐药铜绿假单胞菌对氨基糖苷类和  $\beta$ -内酰胺类抗菌剂耐药的重要机制。

**关键词:**假单胞菌,铜绿; 多重耐药; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)14-1679-03

Genotyping of  $\beta$ -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymesin multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Department of Pneumology\*

Lan Kai, Cheng Zhaomin, Tang Xiaolong, Zhou Qiang, Zhang Wen, Pang Xueyun  
(Department of Clinical Laboratory, Guangdong Province Hospital of  
Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

**Abstract:** Objective To investigate genotyping of  $\beta$ -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes in multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Department of Pneumology in certain hospital. **Methods** DNA of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains were extracted and multi-kinds of resistance-associated genes were detected by using polymerase chain reaction (PCR). **Results** The results of amplification showed GIM, SPM, VIM-1, VIM-2, CTX-M, aac(3')-I, aac(3')-II, ant(3'')-I were negative, and other genes were with different positive rates. **Conclusion** The mechanism of multi-resistance *Pseudomonas aeruginosa* might account of available multi-kinds of resistance associated genes.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; multidrug resistance; resistance gene

铜绿假单胞菌(Pae)是重要的医院感染致病菌,多见于原有心肺疾病,长期使用抗菌剂、激素、抗癌药物以及免疫功能低下,或应用呼吸机、雾化器治疗的病患,因此,Pae已成为呼吸科最常见的医院感染致病菌。由Pae引起的肺部感染起病可急可慢,部分呈隐匿发病。重者有寒战、高热等症状,咳大量黄色脓稠痰,典型者咳翠绿色脓性痰;有气短、进行性紫绀,严重者可出现呼吸衰竭,周围循环衰竭,因此,及时的抗感染治疗对于拯救病患非常重要。而Pae在抗菌剂选择压力下几天就能产生耐药性,尤其随着免疫抑制剂、激素和介入治疗等广泛应用,多重耐药、泛耐药Pae株屡见不鲜,给临床抗感染治疗带来极大的困扰。Pae耐药机制极为复杂,获得多种 $\beta$ -内酰胺酶和氨基糖苷修饰酶,导致对 $\beta$ -内酰胺类抗菌剂和氨基糖苷类抗菌剂耐药<sup>[1-3]</sup>。因此,作者收集了本院呼吸内科分离的多重耐药Pae菌,研究常见 $\beta$ -内酰胺酶和氨基糖苷类修饰酶相关基因携带情况,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株** 2011年本院呼吸科患者分离到多重耐药Pae共计14株(3种不同类型抗菌剂耐药),同一患者不同时期和不同标本类型不重复计入。患者标本类型包括深部痰、中段尿、血、伤口拭子、脓液、胸水等。质控菌株用大肠埃希菌(ATCC25922)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)。

## 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** 西门子 MicroScan WalkAway 96 plus 全自动细菌鉴定及药敏分析仪; BIO-RAD 电泳仪; BIO-RAD Hood 2 成像仪; 高速冰冻离心机; GeneAmp PCR System 9700 PCR 仪。

**1.2.2 试剂** MicroScan WalkAway 96 plus 配套革兰阴性杆菌复合鉴定药敏板(NC31),检测并报告14种抗菌剂:阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/棒酸、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星。K-B法检测抗菌剂:美罗培南。所有药敏纸片均购自Oxoid公司;哥伦比亚血平板、MH琼脂平板均为江门凯林生物有限公司产品。引物由Invitrogen生物工程公司合成;Tap酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、buffer购自Takara公司;琼脂糖购自Sigma,DNA marker购自BBI公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 菌株鉴定及药敏实验** 所有临床分离菌株均用MicroScan WalkAway 96 plus及其配套NC31卡进行鉴定及药敏分析,因该检测卡无美罗培南检测结果,因此美罗培南用K-B法进行检测报告。实验方法与判断标准参照CLSI 2009年版<sup>[4]</sup>。

**1.3.2 耐药基因检测** 采用煮沸法提取细菌DNA<sup>[5]</sup>,于一20℃保存备用。采用聚合酶链反应(PCR)扩增耐药基因。引物序列和目的产物长度见表1。扩增体系为:P1、P2引物各0.5 μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, KCl 10 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8

\* 基金项目:广东省科技计划资助项目(2011B031800028)。

mmol/L, Tris-HCl (pH9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, BSA 0.02% (w/v), Taq DNAase 1 U, 计 15 μL, 另加入模版 DNA 5 μL。PCR 循环参数为: 92 °C 预变性 5 min; 92 °C × 40 s, 55 °C × 40 s, 72 °C × 60 s, 循环 30 次后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察分析, 记录结果。

表 1 耐药基因引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
OprD2	P1:GCGCATCTCCAAGACCATG	193
	P2:GCCACGCGATTTGACGGAG	
IMP-1	P1:CGGCC(G/T)CAGGAG(A/C)G(G/T)CTTT	587
	P2:AACCAGTTTTGCG(C/T)TTAC(C/T)AT	
GIM	P1:CTGTGTAGCGTTGCCAGCTTTA	562
	P2:CAGCCCAAGAGCTAATTGAGG	
SPM	P1:CTGCTTGGATTATCGGGCGCG	784
	P2:CCTTTTCCCGACCTTGCTCG	
VIM-1	P1:ATTCCGGTCCG(A/G)GAGGTCCG	633
	P2:GAGCAAGTCTAGACCCGCCG	
VIM-2	P1:ATGITCAAACqTTTGTAGTAA	801
	P2:CTACTCAACGACTGAGC	
TEM	P1:AGGAAGAGTATGATCAACA	535
	P2:CTCGTCGTTTGGTATGGC	
DHA	P1:AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
	P2:CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
CTX-M	P1:ACGCTGTGTTAGGAAGTG	759
	P2:TTGAGGCTGGGTGCTCG	
OXA-10	P1:CTGTTGTTTGGGTTTCGCAAG	440
	P2:CTTGGCTTTTATGCTTGATG	
VEB	P1:GCGGTAATTTAACCAGA	961
	P2:GCCTATGAGCCAGTGTT	
aac(3')-I	P1:ACCTACTCCCAACATCAGCC	169
	P2:ATATAGATCTCACTACGCGC	
aac(3')-II	P1:ACTGTGATGGGATACGCGTC	237
	P2:CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	
aac(6')-I	P1:ATGACTGAGCATGACCTTGC	519
	P2:TTAGGCATCACTGCGTGTTTC	
aac(6')-II	P1:TTCATGTCGCGAGCACCCC	178
	P2:GACTCTTCCGCCATCGCTCT-	
ant(2'')-I	P1:GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG	320
	P2:CTGTTACAACGACTGGCCCGC	
ant(3'')-I	P1:TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	284
	P2:CGCTAIGTTCTCTTGCTTTTG	

2 结 果

2.1 14 株多重耐药菌药敏情况 本院呼吸内科分离多重耐药 Pae 对第三代头孢药物耐药性较高, 碳青霉烯类抗菌剂总体

耐药率达 50%, 见表 2。

表 2 14 株多重耐药铜绿假单胞菌药敏结果 (%)

抗菌剂	耐药率	中敏率	敏感率
阿米卡星	42.9	0.0	57.1
庆大霉素	57.1	7.1	35.8
妥布霉素	42.9	0.0	57.1
环丙沙星	57.1	14.3	28.6
左氧氟沙星	64.3	21.4	14.3
头孢噻肟	71.4	7.1	11.5
头孢曲松	64.3	21.4	14.3
头孢他啶	42.9	7.1	50.0
头孢吡肟	35.7	21.4	42.9
哌拉西林	71.4	0.0	28.6
哌拉西林/他唑巴坦	35.7	0.0	64.3
替卡西林/克拉维酸	71.4	0.0	28.6
亚胺培南	42.9	7.1	50.0
美罗培南	57.1	0.0	42.9

2.2 PCR 检测耐药基因结果 14 株多重耐药 Pae 菌株 β-内酰胺酶基因以携带 TEM(10/14, 71.4%) 基因为主, 氨基糖苷类修饰酶基因以 aac(6')-I b(8/14, 57.1%) 和 ant2'-1(7/14, 50%) 为主。14 株多重耐药株中有 6 株耐碳青霉烯类, 其耐药基因以 IMP-1 基因(5/6, 83.3%) 多见, 而 OprD2 缺失仅 2 株, 与广州其他地区多重耐药 Pae 相关耐药基因携带情况差别较大<sup>[1]</sup>。具体基因携带情况见表 3。

表 3 14 株多重耐药铜绿假单胞菌基因携带情况

耐药基因	阳性菌株(n)	阳性率 (%)
OprD2 缺失	2	14.3
IMP-1	5	35.7
GIM	0	0
SPM	0	0
VIM-1	0	0
VIM-2	0	0
TEM	10	71.4
DHA	2	14.3
CTX-M	0	0
OXA-10	1	7.1
VEB	1	7.1
aac(3')-I	0	0
aac(3')-II	0	0
aac(6')-I	8	57.1
aac(6')-II	1	7.1
ant(2'')-I	7	50.0
ant(3'')-I	0	0

3 讨 论

鉴于铜绿假单胞菌在抗菌剂选择压力下容易出现耐药且

耐药机制的复杂性,β-内酰胺类和氨基糖苷类抗菌剂联合用药往往是呼吸内科治疗 Pae 感染常用手段,但近年来耐药问题已越来越严重,引起人们对这两种药物耐药基因的关注。Pae 可以通过获得氨基糖苷修饰酶而逃避氨基糖苷类药物攻击。根据酶的功能,氨基糖苷修饰酶可分为乙酰转移酶(ACC)、核苷转移酶(ANT)和磷酸转移酶(APH)三大类<sup>[6]</sup>。14 株多重耐药 Pae 中 aac(6′)-I b 检出 8 株阳性,阳性率 57.1%;ant2′-I 基因有 7 株阳性,阳性率 50%;有 1 株 aac(6′)-II 基因阳性;其余 ant2′-I、aac(3′)-II、aac(3′)-I 基因均无阳性检出。结果显示,对氨基糖苷类抗菌剂耐药的菌株至少表达 1 种修饰酶,同时表达两种以上氨基糖苷类修饰基因的菌株有 5 株,占 35.7%。只要产生一种氨基糖苷修饰酶即可修饰多种氨基糖苷类抗菌剂使之失活,从而导致 Pae 对所有氨基糖苷类药物均表现为耐药<sup>[7]</sup>,说明产生氨基糖苷类修饰酶是本院呼吸内科分离 Pae 耐氨基糖苷类的主要机制。

铜绿假单胞菌对 β-内酰胺耐药的主要原因是产生多种 β-内酰胺酶,如金属酶、超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)和 AmpC 酶。产金属酶是造成铜绿假单胞菌对碳青霉烯类等多种抗菌剂耐药的重要原因。到目前为止,共发现 IMP、VIM、SPM、GIM 和 SIM 5 个不同家族的金属酶<sup>[8]</sup>。铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药的另—重要机制是外膜通道蛋白 OprD2 缺失。OprD2 是以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗菌剂(美罗培南除外)进入 Pae 体内的特异性通道,其他 β-内酰胺类抗菌剂不能通过 OprD2 通道,因此,OprD2 缺失引起的碳青霉烯类耐药与其他 β-内酰胺类抗菌剂之间无交叉耐药性<sup>[9-11]</sup>。检测结果显示,IMP-1 阳性菌株占全部菌株的 35.7%,占碳青霉烯类耐药(美罗培南或亚胺培南耐药)菌株的 62.5%;外膜通道蛋白 OprD2 缺失仅 2 株,占耐碳青霉烯类菌株的 25.0%,全部菌株的 14.3%,说明产生 IMP-1 型金属酶是本院呼吸内科住院患者分离 Pae 对碳青霉烯类抗菌剂耐药的主要原因之一。

ESBLs 是由细菌质粒介导的能水解氧氨基 β-内酰胺类抗菌剂,并可被 β-内酰胺酶抑制剂抑制的一类 β-内酰胺酶,目前已发现 200 余种,根据编码的不同分为:TEM、SHV、CTX-M、OXA 和其他共 5 大类<sup>[12]</sup>。检测结果显示,TEM 阳性率最高,达 71.4%。TEM 型 ESBLs 是由广谱酶 TEM-1 和 TEM-2 的编码基因突变造成 1~4 个氨基酸改变而形成的一系列酶蛋白<sup>[13]</sup>。TEM 基因阳性菌株的表达产物能水解青霉素、I~III 代头孢菌素等 β-内酰胺类药物,使铜绿假单胞菌常常对多种药

物同时耐药<sup>[7]</sup>。由此推测,携带 TEM 基因可能是本院呼吸内科分离 Pae 对多种第三代头孢菌素耐药的重要原因。

细菌对抗菌剂耐药形势日趋严重,仅靠药敏结果分析其耐药表型已经远远不能满足临床抗感染治疗和耐药监测的需要。只有从基因分型出发,研究耐药菌株产生和播散的分子机制,才能为抗菌剂的合理使用、新药开发、医院感染监测等方面提供更好的帮助和指导。

参考文献

- [1] 叶惠芬,陈惠玲,刘平,等. 广州地区多重耐药铜绿假单胞菌相关耐药基因的研究[J]. 检验医学,2010,25(4):288-291.
- [2] 曹晓慧,胡杰贵,王中新. 多重耐药铜绿假单胞菌 β-内酰胺酶耐药基因分析[J]. 安徽医科大学学报,2010,45(4):529-531.
- [3] 史伟峰,王玉月,何伟珍,等. 铜绿假单胞菌氨基糖苷类药物修饰酶基因研究[J]. 检验医学,2007,22(1):67-70.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement[S]. Wayne,PA:CLSI.
- [5] Sambrook J,Russell D. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 3 版. 北京:科学出版社,2002:36-39.
- [6] 植志全,何志恒,江鹏,等. 多重耐药绿脓假单胞菌 β-内酰胺类、氨基糖苷类耐药相关基因研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(11):1211-1214.
- [7] 陈茶,黄彬,蓝锴,等. 铜绿假单胞菌“泛耐株”相关基因研究[J]. 中国抗菌剂杂志,2009,34(2):111-113.
- [8] 蓝锴,陈茶,庞雪云,等. 铜绿假单胞菌获得性金属 β-内酰胺酶及其相关基因研究[J]. 重庆医学,2010,39(23):3155-3157.
- [9] 陈瑞,唐英春,朱家馨,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌外膜蛋白 D 基因突变检测[J]. 中华传染病杂志,2006,24(2):80-83.
- [10] 衣美英,王鹏远,黄汉菊,等. 外排泵高表达和外膜蛋白缺失在铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药中的作用[J]. 中华医学杂志,2006,86(7):457-462.
- [11] 马骥,黄彬,蓝锴. 重症监护室多重耐药铜绿假单胞菌耐药基因分型研究[J]. 广东医学,2010,31(10):1268-1269.
- [12] Carmichael G. ESBLs:the next challenge in infection control[J]. Lancet Infect Dis,2004,4(8):480.
- [13] 朱佑明,李文桂. 细菌耐药机制研究现状[J]. 重庆医学,2006,35(13):1224-1226.

(收稿日期:2012-04-03)

(上接第 1678 页)

- 1108-1109.
- [7] Strevens H,Wide-Swensson D,Torffvit O,et al. Serum cystatin C for assessment of glomerular filtration rate in pregnant and non-pregnant women. Indications of altered filtration process in pregnancy[J]. Scand J Clin Lab Invest,2002,62:141-148.
- [8] 殷少华,马杰. 血清 C 反应蛋白、白介素-6、白介素-8 与尿胰蛋白酶原活性肽联合检测在急性胰腺炎早期病情判断中的意义[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(13):1476-1477.
- [9] Karinen,Liisa,Leinonen,et al. Maternal serum Chlamydia pneu-

moniae antibodies and CRP levels in women with preeclampsia and gestational hypertension[J]. Hypertension in Pregnancy,2008,27(2):143-158.

- [10] 沈方方. 妊娠高血压综合征患者 C 反应蛋白与尿蛋白水平分析[J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(23):3620-3621.
- [11] 廖小清,阮珍. 妊娠期高血压疾病患者血清超敏 C-反应蛋白和微量清蛋白的检测意义[J]. 吉林医学,2011,32(21):4323-4324.

(收稿日期:2011-12-18)